

**Eine hohe Expression von KIT und PDGFRA ist mit  
einem kurzen Überleben der Patienten mit  
neuroendokrinen Tumoren assoziiert – Mutationen  
an den Hotspots sind jedoch selten**

**Dissertation**

**Zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor medicinae dentariae (Dr.med.dent.)**

**Vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

**von Christine Danielczok  
geboren am 29.11.1986 in Sonneberg**

**Gutachter**

1. ....

2. ....

3. ....

**Tag der öffentlichen Verteidigung:**

## ***Inhaltsverzeichnis***

|  |           |
|--|-----------|
| <b><i>Abkürzungsverzeichnis</i></b> .....                    | <b>5</b>  |
| <b><i>1. Zusammenfassung</i></b> .....                       | <b>6</b>  |
| <b><i>2. Einleitung</i></b> .....                            | <b>8</b>  |
| <b>2.1. Gastrointestinale neuroendokrine Tumoren</b> .....   | <b>10</b> |
| 2.1.1 Neuroendokrine Tumoren des Magens .....                | 10        |
| 2.1.2 Neuroendokrine Tumoren des Duodenums .....             | 12        |
| 2.1.3. Neuroendokrine Tumoren des Jejunum und Ileum .....    | 13        |
| 2.1.4. Neuroendokrine Tumoren der Appendix .....             | 14        |
| 2.1.5. Neuroendokrine Tumoren des Kolon und Rektum .....     | 14        |
| <b>2.2 Pankreatische neuroendokrine Tumoren</b> .....        | <b>16</b> |
| <b>2.3 Klassifikation</b> .....                              | <b>18</b> |
| <b><i>3. Ziele der Arbeit</i></b> .....                      | <b>21</b> |
| <b><i>4. Material und Methode</i></b> .....                  | <b>22</b> |
| 4.1. Tumorkollektiv .....                                    | 22        |
| 4.2 Gewebe-Array-Verfahren .....                             | 23        |
| 4.3 Immunhistochemie .....                                   | 23        |
| 4.4 Mutationsanalyse von KIT und PDGFRA .....                | 25        |
| 4.5 Statistische Methodik .....                              | 27        |
| <b><i>5. Ergebnisse</i></b> .....                            | <b>28</b> |
| 5.1 Klinisch-pathologische Untersuchungsergebnisse .....     | 28        |
| 5.2 Immunhistochemie .....                                   | 30        |
| 5.3 Korrelation von klinisch-pathologischen Parametern ..... | 32        |
| 5.4 Überlebensanalyse .....                                  | 32        |
| 5.4.1 Univariate Überlebensanalyse .....                     | 32        |
| 5.4.2 Multivariate Überlebensanalyse .....                   | 35        |
| 5.5 Mutationsanalyse der GEP NET .....                       | 36        |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>6. Diskussion .....</b>                       | <b>37</b> |
| <b>7. Zusammenfassung.....</b>                   | <b>41</b> |
| <b>8. Literatur- und Quellenverzeichnis.....</b> | <b>42</b> |
| <b>9. Anhang .....</b>                           | <b>45</b> |
| <b>9.1. Tabellarischer Lebenslauf.....</b>       | <b>45</b> |
| <b>9.2. Danksagung .....</b>                     | <b>47</b> |
| <b>9.3. Ehrenwörtliche Erklärung .....</b>       | <b>48</b> |

## Abkürzungsverzeichnis

|        |  |
|--------|--|
| CAG    | chronisch-atrophische Korpusgastritis                            |
| CD     | Cluster of Differentiation                                       |
| CK     | Cytokeratin  |
| DNA    | desoxyribonucleic acid   |
| ECL    | enterochromaffin-like  |
| GEP    | gastro-entero-pankreatisch                                       |
| Ki67   | Proliferationsindex Kinesin 67                                   |
| KIT    | Protein aus der Familie der Rezeptor-Tyrosinkinasen              |
| K-RAS  | Kirsten rat sarcoma  |
| NEC    | Neuroendokrines Carcinom   |
| NEN    | Neuroendokrine Neoplasie   |
| NET    | Neuroendokriner Tumor  |
| MEN-1  | Multiple Endokrine Neoplasie Typ 1                               |
| PCR    | polymerase chain reaction  |
| PDGFRA | platelet-derived growth factor receptor alpha                    |
| S100   | calcium binding protein with 100 %-Solubility in Ammoniumsulfate |
| WHO    | World Health Organization  |
| ZES    | Zollinger-Ellison-Syndrom  |

## 1. Zusammenfassung

Die Inzidenz der neuroendokrinen Tumoren des Gastrointestinaltraktes (GEP-NETs) ist in den letzten 30 Jahren signifikant angestiegen. Dies resultiert zum Teil aus einer verbesserten Diagnose von gutartigen und zufällig gefundenen Läsionen aufgrund der besseren Verfügbarkeit von moderner endoskopischer und radiologischer Bildgebung und zum anderen durch eine erhöhte Aufmerksamkeit auf diese seltenen Tumoren (Massironi et al. 2008, Modlin et al. 2008). Die SEER Datenbank, welche den Pflegestandard eines Durchschnitts-US-Bürgers widerspiegelt, zeigt, dass die altersabhängige Inzidenz bei Karzinoiden des Dünndarms und des Verdauungssystems um 460% und 720% angestiegen ist (Modlin et al. 2008).

Neuroendokrine Tumoren des Gastrointestinaltraktes (GEP NET) sind mit nur 2% aller bösartigen Tumoren der westlichen Welt sehr selten. Das Wissen über das heterogene Erscheinen hinsichtlich ihrer Lokalisation, ihres biologischen Verhaltens, ihres klinischen Erscheinungsbildes und der Prognose hat sich in den letzten 2 Jahrzehnten stark erweitert (Anlauf et al. 2010).

Inzwischen ist bekannt, dass einige Subgruppen von neuroendokrinen Tumoren existieren, die alle ein unterschiedliches biologisches Verhalten zeigen. Einige der klinischen und pathologischen Eigenschaften dieser Tumoren sind vom jeweiligen Ursprungsorgan charakterisiert, andere Verhaltensweisen teilen neuroendokrine Neoplasien unabhängig von ihrem anatomischen Herkunftsort (Klimstra et al. 2010). Es sind weitere Studien mit internationaler Standardisierung nötig um die Ergebnisse richtig zu vergleichen. Erforderlich sind auch neue diagnostische, prognostische und prädiktive Marker, um diese Tumoren zu charakterisieren.

Genomweite Expressionsprofile haben eine Anzahl von Genen identifiziert, die eine vermehrte Expression in gastro-entero-pankreatischen neuroendokrinen Tumoren aufweisen.

Die Ziele dieser Arbeit waren es, diese Gene auf der Proteinebene zu validieren. Besonderes Augenmerk lag dabei auf KIT und PDGFRA, beides Proteine aus der Familie der Rezeptor-Tyrosinkinasen. Anschließend sollte die Expression mit klinisch-pathologischen Parametern korreliert werden. Zuletzt sollten eventuell vorliegende sogenannte aktivierende Mutationen durch Analyse von Tumoren mit

hoher Expression identifiziert werden, die als Ansatzpunkt für eine Therapie durch Inhibition der Tyrosinkinase geeignet wären.

Die Untersuchungen wurden anhand der neuen, international standardisierten WHO-Klassifikationen durchgeführt.

Hierzu wurden gastroenteropankreatische neuroendokrine Tumoren (GEP NET) von 119 Patienten auf die Expression von zehn Biomarkern untersucht. Die Gewebeproben dieser Arbeit entstammen dem Tumorkollektiv des Institutes für Pathologie des Universitätsklinikums Jena. Die immunhistochemische Anfärbung wurde anhand einer 4-Stufen-Skala eingeschätzt: negativ (0), schwach positiv (1), mäßiggradig positiv (2) und stark positiv (3). Diese wurde auf ein 2-Stufen-System reduziert, wobei 0/1 als negative und 2/3 als positiv gewertet wurde. Bei den Proben, die eine hohe Expression von KIT und PDGFRA zeigten, wurde eine Mutationsanalyse von KIT (Exon 9, 11, 13 und 17) und PDGFRA (Exon 12 und 18) durchgeführt.

Im Ergebnis zeigte sich eine hohe Expression von KIT in 13% aller Proben, von PDGFRA in 33%, von CK19 in 26%, von CK7 in 5%, von CK20 in 5%, von S100 in 6%, von CD56 in 25%, von Chromogranin in 55% und von Synaptophysin in 80%. Eine hohe Expression von KIT und PDGFRA war mit einem signifikant kürzerem Überleben der Patienten korreliert ( $p=0,003$ ,  $p=0,018$ ). Die multivariate Analyse zeigte, dass PDGFRA Expression, Residualstatus und WHO Grading einen unabhängigen Einfluss auf das krankheitsspezifische 10-Jahresüberleben vorweisen ( $p=0,032$ ,  $p=0,001$  und  $p=0,008$ ). Die Mutationsanalyse der 51 Proben mit hoher Expression offenbarte eine neue Mutation von KIT in Exon 11 (K558N\_V559insP) bei einem gut differenzierten metastasierten pankreatischen neuroendokrinen Tumor.

Zusammenfassend war festzustellen, dass eine hohe Expression von KIT und PDGFRA signifikant mit einem kürzeren Überleben der Patienten korreliert und somit könnten KIT und PDGFRA als prognostische Marker dienen. Mutationen des KIT Genes könnten neue Wege für die Rezeptor-Tyrosinkinase Inhibitionstherapie in einer Subgruppe von Patienten mit fortgeschrittenen pankreatischen neuroendokrinen Tumoren öffnen. Weitere Studien sind jedoch notwendig

## 2. Einleitung

Neuroendokrine Tumoren können von neuroendokrinen Zellen im gesamten Körper stammen und in ihrer Biologie, dem klinischen Verhalten, dem Ansprechen auf Behandlung und dem Ausgang der Erkrankung stark variieren. Sie stellen also eine beachtliche Herausforderung an alle Fachrichtungen dar, die in die Betreuung dieser Patienten involviert sind (Basu et al. 2010, Modlin et al. 2008, Pape et al. 2008, Rossi et al. 2005).

In den letzten drei Jahrzehnten ist die Zahl von gastro-entero-pankreatischen neuroendokrinen Tumoren nicht nur aufgrund des verbesserten Wissens und der besseren diagnostischen Möglichkeiten wesentlich angestiegen (Diagramm 1) (Modlin et.al. 2008). Diese seltenen Tumoren machen ca. 2% aller gastrointestinalen Tumoren aus. Schätzungen zufolge kommt es weltweit zu 2,5-5/100 000 Neuerkrankungen pro Jahr (Modlin et al. 2003). GEP NET haben ihren Ursprung im diffusen neuroendokrinen System des Gastrointestinaltraktes und des Pankreas. Hier finden sich mindestens 16 unterschiedliche Typen von endokrinen Zellen, die mehr als 50 Peptide oder Amine produzieren (Massironi et al. 2008).

Neuroendokrine Tumoren können neben dem Gastrointestinaltrakt (67,5%) auch im bronchopulmonalen System (25,3%), sowie der Hypophyse, der Schilddrüse, der Nebenschilddrüse, dem Thymus, der Nebennierenrinde, dem Rückenmark und den Paraganglien auftreten. Im Bereich des Gastrointestinaltraktes sind Tumoren des Ileums am häufigsten zu finden (31%). Es folgen Rektum mit 21% und Appendix mit 18%. Weniger häufig finden sich Tumoren in Colon (12%), Magen (6%), Duodenum (4%) und Jejunum (3%) (Turaga und Kvols, 2011).

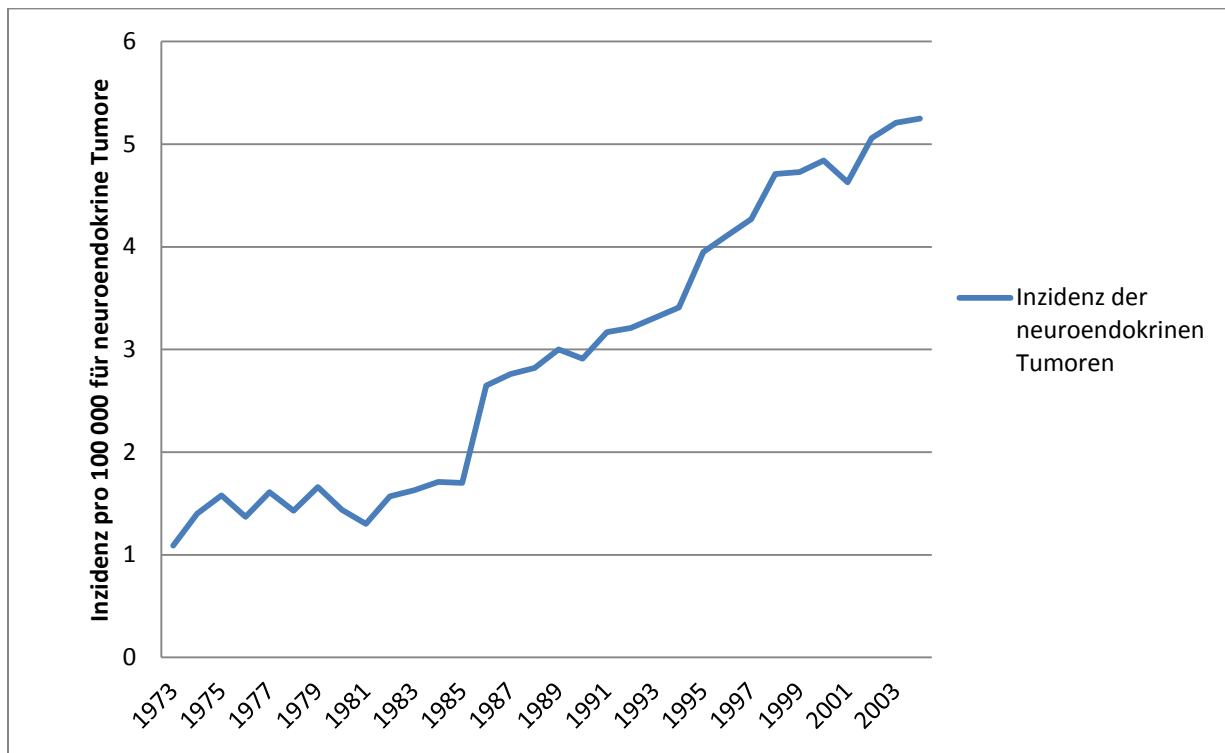
Das klinische Verhalten von GEP NET ist sehr vielfältig. Die meisten dieser Tumoren sind funktionell inaktiv und zeigen sich erst spät mit Schwellungen, Fernmetastasen oder beidem. Eine verzögerte Diagnostik von fünf bis sieben Jahren nach dem Beginn der ersten Symptome ist häufig und erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass die Patienten eine fortgeschrittene Krankheit und Metastasen aufweisen (Modlin et al. 2008). Symptome äußern sich ähnlich einer Obstipation mit abdominalem Schmerz, Übelkeit, Erbrechen, Cholestase oder durch zufällig gefundene Metastasen.

Es können auch typische Syndrome einer hormonellen Hypersekretion auftreten (Massironi et al. 2008).



Normalerweise treten GEP NET sporadisch auf, können aber auch multiple sein oder bei einigen genetischen Syndromen entstehen, wie zum Beispiel die Multiple Endokrine Neoplasie (MEN) Typ 1, von Hippel-Lindau Syndrom, Neurofibromatose Typ 1 und der tuberösen Sklerose (Massironi et al. 2008).

*Diagramm 1: Inzidenz der neuroendokrinen Tumoren von 1973 bis 2003*



(modifiziert nach Turaga und Kvols, 2011)

## **2.1. Gastrointestinale neuroendokrine Tumoren**

### **2.1.1 Neuroendokrine Tumoren des Magens**

Gastrale NET leiten sich größtenteils von ECL- (enterochromaffin-like) Zellen ab. Bei diesen Zellen handelt es sich um histaminspeichernde Zellen im Magenfundus und Corpus, die wesentlich an der Regulation der Salzsäureproduktion beteiligt sind. Die NET des Magens lassen sich in vier biologisch relevante Typen einteilen.

Dem Typ 1 sind 80% aller gastralen NET zuzuordnen. Es sind vor allem Frauen (70-80% der Fälle) im Alter zwischen 50 und 60 Jahren betroffen. Typischerweise zeigt sich der Typ-1-NET als kleiner und multifokaler hoch differenzierter ECL-Zelltumor ausschließlich im Korpus/Fundus des Magens und weist eine niedrige Proliferationsaktivität auf. Endoskopisch finden sich multiple kleine breitbasig-runde polypöse Schleimhauttumoren von 0,5-1 cm Durchmesser, die klinisch in der Regel mit keinen spezifischen gastralen Beschwerden verbunden sind. Mikroskopisch sind diese NET trabekulär aufgebaut und überwiegend auf die Mukosa und Submukosa beschränkt und zeigen keine Angioinvasion.

Der Tumorgenese liegt eine autoimmune chronisch-atrophische Korpusgastritis (CAG) zugrunde. Diese CAG ist u.a. Folge einer autoimmunen Zerstörung der spezifischen Drüsen der Korpus Schleimhaut.

Zum Diagnosezeitpunkt wiesen maximal 8% der Fälle Lymphknotenmetastasen auf und diese scheinen nur bei Tumoren vorzukommen, die größer als 2 cm sind (Klöppel 2003).

Die Prognose der Typ-1-NET ist günstig. Eine Operationsindikation ist lediglich ab einer Größe von über 2 cm zu erwägen. Es erfolgen jährlich endoskopische Kontrollen.

Typ 2 der gastralen NET finden sich in Zusammenhang mit dem autosomal-dominant vererbtem Multiplen Endokrinen Neoplasie Typ 1 (MEN-1) Syndrom und einem Zollinger-Ellison-Syndrom bei duodenalem Gastrinom. Das Zollinger-Ellison-Syndrom macht sich klinisch durch therapieresistente rezivierende Ulzera bemerkbar (Bornschein et al. 2008). Die MEN-1-/ZES-assoziierten Typ-2-NET zeigen sich makroskopisch als multiple kleine (>1cm) submuköse Tumoren im Magenkorpus und –Fundus auf dem Boden einer ECL-Zellhyperplasie. Sie treten bei beiden

Geschlechtern gleich häufig auf und das mittlere Alter liegt bei 45 Jahren. Mikroskopisch sind die Tumoren gut differenziert und trabekulär gestaltet.

In ca. 12 % der Fälle treten Lymphknotenmetastasen auf. Hier scheint auch die Tumorgroße eine Rolle zu spielen, da eine Metastasierung vor allem bei Tumoren über 2 cm auftritt. Desweiteren ist eine Metastasierung bei nachgewiesener Angioinvasion und/oder einer Infiltration der Muskularis propria feststellbar.

Der Typ-3-NET macht als sporadischer Tumor etwa 15% der Fälle aus und ist mit keiner weiteren Erkrankung assoziiert. Er tritt polypoid, solitär auf und kann überall im Magen vorkommen. Außerdem ist er nicht mit einer ECL-Hyperplasie und CAG assoziiert. Das männliche Geschlecht wird etwas bevorzugt und das mittlere Alter der Patienten liegt bei 50 Jahren. Ungefähr ein Viertel der Tumoren sind größer als 2 cm. Bei 26% der Patienten lassen sich zum Zeitpunkt der Diagnose regionale Lymphknotenmetastasen und bei 8% Fernmetastasen in der Leber feststellen. In der Regel sind die Tumoren 2 cm oder größer. Mikroskopisch finden sich solide und trabekuläre Muster und eine gelegentliche Angioinvasion, die mit dem Nachweis von Metastasen korreliert und eine verstärkte Zellpolymorphie.

Bei den meisten Patienten treten uncharakteristische epigastrische Beschwerden auf und bei nur 7% (alle mit Lebermetastasen) ein „atypisches“ Karzinoidsyndrom mit Flush und Asthmaattacken bedingt durch die Histaminausschüttung. Tumoren mit einem Durchmesser von mehr als 2 cm und/oder mit einem hormonellem Syndrom sind als prognostisch ungünstiger anzusehen, da hier zum Zeitpunkt der Diagnose bereits mit Metastasen gerechnet werden muss. In diesen Fällen ist eine Resektion indiziert. Bei Tumoren von einer Größe unter 2 cm ist die Vorgehensweise umstritten, jedoch sieht es so aus, dass nur solche Tumoren, die nicht endoskopisch entfernt werden können oder solche, die eine Angioinvasion aufweisen, chirurgisch entfernt werden sollten.

Typ 4 der gastralen NET ist sehr selten zu finden und tritt ebenso wie Typ 3 sporadisch und ohne bevorzugte Lokalisation auf. In über 90% der Fälle haben die Tumoren zum Zeitpunkt der Diagnose schon metastasiert und eine Größe von 5-7 cm erreicht. Die Tumoren weisen undifferenzierte mittelgroße bis kleine Zellen auf und es zeigen sich zahlreiche Mitosen und eine Angioinvasion.

Die Prognose für die Typ-4-NET ist äußerst ungünstig. Die Therapie muss wie bei üblichen Magenkarzinomen erfolgen (Klöppel 2003, Anlauf et al. 2010).

### 2.1.2 Neuroendokrine Tumoren des Duodenum

Neuroendokrine Tumoren des Duodenum treten am häufigsten um das 60. Lebensjahr und vermehrt bei Männern auf. Derzeit können fünf Typen dieser Tumoren unterschieden werden. Die duodenalen Gastrinome machen 2/3 aller duodenalen NET aus. Desweiteren treten duodenale NET mit Somatostatinproduktion, funktionell inaktive serotonin-, gastrin- oder calcitoninproduzierende Tumoren und gangliozytische Paragangliome auf (Modlin et al. 2005).

Duodenale NET mit Gastrinproduktion treten sporadisch auf oder im Rahmen eines MEN-Syndroms und sind dann Ursache einer Hypergastrinämie mit ZES. Die Gastrinome sind gewöhnlich nicht größer als 1 cm und bevorzugen das proximale Jejunum. Trotz der geringen Größe und der Begrenzung auf Mukosa und Submukosa finden sich zum Zeitpunkt der Diagnose oft Metastasen in paraduodenalen Lymphknoten, die oft größer sind als der Primärtumor selbst. Diese Besonderheit ist wahrscheinlich auch der Grund, warum in der Vergangenheit häufig von Lymphknotengastrinomen gesprochen wurde, die auf nicht erkannte Mikrogastrinome im Duodenum zurückzuführen sind. Lebermetastasen treten erst relativ spät auf, weshalb die Prognose, im Gegensatz zu vielen pankreatischen Gastrinomen, günstig ist. Histologisch zeigt sich ein glandulärer bis trabekulärer Aufbau und immunologisch lässt sich in allen Fällen Gastrin nachweisen.

Somatostatin produzierende duodenale NET machen etwa 15-20% aller duodenalen Tumoren aus. Sie sind meist in der Gegend der Papilla Vateri als solitär auftretende Tumoren zu finden. Bei Tumoren die größer als 2 cm sind, eine Invasion der Muskularis propria aufweisen und/oder angioinvasiv sind, ist mit regionären Lymphknotenmetastasen zu rechnen. Histologisch zeichnen sich die Tumoren durch ein hoch differenziertes trabekuläres bis pseudoglanduläres Muster mit häufig vorkommenden Psammomkörpern aus. Immunhistologisch zeigt sich eine intensive Somatostatinpositivität. Trotzdem zeigt sich kein hormonelles Syndrom. Kalzitininpositive Tumoren sind selten. In ca. 1/3 der Fälle liegt eine Assoziation mit einer Neurofibromatose Typ 1 (von Recklinghausen) vor. Zudem kann simultan eine Kombination mit einem ein- oder doppelseitigen Phäochromozytom bestehen, ohne dass es eine Beziehung zum von-Hippel-Lindau-Syndrom gibt.

Gangliozytische Paragangliome finden sich periampullär und sind oft größer als 2 cm, zeigen aber mit wenigen Ausnahmen ein benignes Verhalten. Mikroskopisch zeigen sich einzelne oder in Gruppen liegende gangliozytische Elemente gemischt mit gut differenzierten neuroendokrinen Zellen. Immunhistologisch exprimieren sie häufig Somatostatin, Pankreatisches Polypeptid und S-100.

Duodenale NET mit Serotoninproduktion sind funktionell inaktiv und verhalten sich bei einer Größe von 1-2 cm benigne. Sie liegen solitär im proximalen Duodenum. Sie zeigen einen trabekulären Aufbau und enthalten neben serotoninpositiven Zellen auch einige somatostatin- und/oder gastrinpositive Zellen.

Undifferenzierte duodenale NET sind äußerst selten und liegen überwiegend in oder an der Papilla Vateri. Zum Zeitpunkt der Diagnose liegen häufig schon Metastasen der regionalen Lymphknoten und der Leber vor. Sie sind hormonell inaktiv und histologisch vom kleinzelligen oder intermediären Typ (Klöppel 2003, Klöppel 2007).

### **2.1.3. Neuroendokrine Tumoren des Jejunum und Ileum**

Am häufigsten treten diese NET im distalen Ileum auf, seltener sind sie im Jejunum und Meckel-Divertikel lokalisiert. Sie machen ungefähr ein Viertel aller gastrointestinalen NET aus und gehören mit zu den häufigsten NEN des GEP-Systems. Das Durchschnittsalter liegt zwischen 50 und 70 Jahren und beide Geschlechter sind gleichermaßen betroffen.

Die Tumoren zeigen sich makroskopisch als polypöse oder flache Erhabenheit und treten in 40% der Fälle multipel auf. Sie sind zwischen 0,5 und 3 cm groß. Zum Zeitpunkt der Diagnose sind die NET in der Regel größer als 1 cm, haben bereits die Muskularis propria infiltriert und in regionale Lymphknoten oder die Leber metastasiert. Während die Wahrscheinlichkeit von Metastasen bei Tumoren unter 1 cm Größe nur bei 2% liegt, haben Tumoren über 2 cm in 100% der Fälle metastasiert. Ein Karzinoidsyndrom kann sich nur bei Patienten mit Lebermetastasen entwickeln, da das im Überschuss freigesetzte Serotonin, welches über die Pfortader zu Leber gelangt, dort nicht mehr abgebaut werden kann und direkt in den Kreislauf gelangt.

Symptome des Karzinoidsyndroms sind Flush, Diarrhoe und Endokardfibrose der Trikuspidalklappe.

Histologisch zeigt sich ein solides („inselartiges“) Muster mit pallisadenartiger Stellung der peripheren Zellen.

Immunhistologisch sind in den Zellen Serotonin, Substanz P, Kallikrein und Katecholamine nachzuweisen (Klöppel 2003, Anlauf et al. 2010, Klöppel 2007).

#### **2.1.4. Neuroendokrine Tumoren der Appendix**

Der NET ist der häufigste Appendixtumor und gehört zu den häufigsten gastrointestinalen NEN. Weibliche Patienten sind häufiger betroffen und das mittlere Lebensalter der Patienten liegt bei etwa 40 Jahren (Anlauf et al. 2010, Klöppel 2003). Die Tumoren liegen häufig in der Appendixspitze oder im distalen Drittel der Appendix und infiltrieren häufig die Submukosa, Muskularis propria und nicht selten auch das Fettgewebe der Mesoappendix. Trotzdem ist ihre Prognose wesentlich günstiger als bei ilealen NET. Bei fortgeschrittenen Fällen über 2 cm oder bei tiefer Infiltration der Mesoappendix ist mit regionären Lymphknotenmetastasen zu rechnen. Diese sind mit 2 % aller Fälle allerdings sehr selten. Deshalb ist bis zu einer Größe von 2,5-3 cm eine Appendektomie ausreichend. Mikroskopisch zeigt sich ein vergleichbarer Aufbau wie bei ilealen NET mit überwiegend insulärem und argentaaffinem Muster. Immunhistochemisch kann Serotonin und Substanz P nachgewiesen werden (Klöppel 2003, Klöppel 2007, Anlauf et al. 2010).

#### **2.1.5. Neuroendokrine Tumoren des Kolon und Rektum**

Die NET des Kolon sind sehr seltene und relativ große (3-4 cm), polypöse, oft ulzerierte niedrig differenzierte Tumoren. Zum Zeitpunkt der Diagnose haben 50-60 % bereits metastasiert. Immunhistologisch zeigen sie sich synaptophysin-positiv und weisen vereinzelt serotonin- und somatostatin-positive Zellen auf.

Bei den weit häufigeren rektalen NET ist die Prognose deutlich besser, da sie endoskopisch oft als kleine (<1 cm), über der Muskularis propria verschiebliche

Tumoren auffallen, hoch differenziert und meistens benigne sind. Je größer die Tumoren sind, umso höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass Metastasen zu finden sind. Gibt es bei einer Größe unter 1 cm in nur 1,7% der Fälle Metastasen, sind es bei einer Größe von 1-2 cm schon 10% und bei einer rektalen NET über 2 cm liegen bereits in 82 % der Fälle Metastasen vor (Klöppel 2003). Immunhistologisch zeigt sich eine Positivität für Glukagon und pankreatisches Polypeptid. Die seltenen schlecht differenzierten klein- oder großzelligen neuroendokrinen Karzinome haben eine ähnlich schlechte Prognose wie im Kolon (Klöppel 2007, Anlauf et al. 2010).

## **2.2 Pankreatische neuroendokrine Tumoren**

Die meisten NET des Pankreas sind gut differenziert und 40-60% sind hormonell aktiv. Sie zeigen typische Syndrome, die aus der weitgehend unkontrollierten Hormonsekretion resultieren. Diese Hormone sind Insulin, Gastrin, Vasoaktives Intestinales Polypeptid (VIP), Glukagon oder seltenere Hormone wie Adrenokortikotropes Hormon (ACTH) oder Wachstumshormon (GH). Daraus resultierende Symptome sind z.B. Hypoglykämie verursacht durch Insulin, Zollinger-Ellison-Syndrom aufgrund von Gastrinproduktion, Verner-Morrison-Syndrom durch VIP, Glukagonom-Syndrom durch Glukagon, Cushing-Syndrom als Folge erhöhter ACTH Produktion und Akromegalie mit vermehrter GHRH Produktion als Ursache.

Im Pankreas treten neuroendokrine Tumoren in jedem Alter und bei beiden Geschlechtern gleich häufig auf. Sie finden sich in allen Bereichen des Pankreas und zeigen sich als gut abgegrenzte, meist solitäre Tumoren mit einem Durchmesser von 1 bis 4 cm. Mit Ausnahme des Insulinoms sind die meisten NET maligne, obwohl sie histologisch gut differenziert sind. Zeichen der Malignität sind eine Tumorgroße über 2 cm, Angioinvasion, eine proliferative Aktivität über 2%, sowie Metastasen in den regionalen Lymphknoten oder einer Infiltration benachbarter Organe (Schmitt et al. 2007).

Die häufigsten pankreatischen NET sind Insulinome und Gastrinome. Aufgrund der meist (90%) geringen Größe von 1-2 cm zeigen die Insulinome dann ein benignes Verhalten. Häufig treten die Insulinome einzeln auf. In ca. 10% der Fälle liegen sie allerdings multiple vor oder im Rahmen einer MEN-1. Diese zeigen allerdings keine gesteigerte Malignitätsrate. Klinische Symptome sind eine Hypoglykämie beim Fasten und neuroglykopenische Symptome. Außerdem führt die Ausschüttung von Katecholamine aufgrund der Hypoglykämie zu Symptomen wie Schwitzen, Zittern und Herzrasen (Massironi et al. 2008).

Gastrinome haben zum Zeitpunkt der Diagnose meist eine Größe von mehr als 2 cm und damit zu etwa 60% bereits metastasiert.

Seltene NET mit hormonellen Syndromen sind VIPome, Glukagonome, ACTH- und Wachstumshormon-produzierende Tumoren, die bei der Diagnose häufig metastasiert haben und über 2 cm groß sind. Für nichtfunktionelle Tumoren gilt das



ebenso. Diese machen sich häufig erst im fortgeschrittenen Stadium durch unspezifische Symptome (z.B. Oberbauchschmerz) bemerkbar und werden deshalb oft erst spät diagnostiziert (Anlauf et al. 2010).

## 2.3 Klassifikation

Nach der WHO-Klassifikation aus dem Jahr 2000 wurden die GEP NET in gut differenzierte neuroendokrine Tumoren (NET, <2 cm Größe, <2% Ki-67 Index), gut differenzierte Karzinome (>2 cm Größe, >2 cm Ki-67 oder Angioinvasion) und schlecht differenzierte neuroendokrine Karzinome (Ki-67>20%) eingeteilt (Abbildung 1). Der Begriff „Karzinoid“ wurde mit den Begriffen gut differenzierter neuroendokriner Tumoren und gut differenziertes neuroendokrines Karzinom gleichgesetzt. Entsprechend der Lokalisationen Magen, Duodenum, Jejunum-Ileum, Appendix, Kolon-Rektum und Pankreas wurden die GEP NET zur weiteren prognostischen Unterteilung unterschieden (Anlauf et al. 2010, Öberg und Castellano 2011).

2004 wurde diese Klassifikation erneuert und schließlich 2010 nochmals aktualisiert. In der neuesten Fassung wurden grundlegende Kriterien der WHO-Klassifikation von 2010 wie Differenzierung und Proliferation beibehalten, Lokalisation, Tumorgröße, Tumorausbreitung und Angioinvasion wurden allerdings in die TNM Stadieneinteilung verlagert (Anlauf et al. 2011).

Die neue Klassifikation von 2010 geht davon aus, dass alle NEN potenziell maligne sind, sich jedoch hinsichtlich der Wahrscheinlichkeit zu metastasieren unterscheiden. (Anlauf et al. 2010, Anlauf et al. 2011) Entscheidend ist also nicht mehr ein gut- oder bösartiges Verhalten, sondern die proliferative Aktivität. So werden die Tumoren in G1 (Ki67≤2%), G2 (Ki67>2-20%) und G3 (Ki67> 20%) eingeteilt (Rindi et al. 2006). Die benignen, hochdifferenzierten neuroendokrinen Tumoren und die niedrig malignen hochdifferenzierten neuroendokrinen Karzinome werden jetzt unter dem Begriff neuroendokriner Tumor (NET) G1 oder G2 zusammengefasst. Ein G1-NET ist dem Karzinoid gleichzusetzen. Als neuroendokrines Karzinom (NEC) werden alle schlecht differenzierten NEN zusammengefasst, die wiederum in einen kleinzelligen und einen großzelligen Subtyp unterteilt werden können. Hinsichtlich ihrer Proliferation sind alle NEC den G3-Tumoren zuzuordnen.

**Tabelle 1** WHO Klassifikationen der neuroendokrinen Neoplasien im Wandel der Zeit

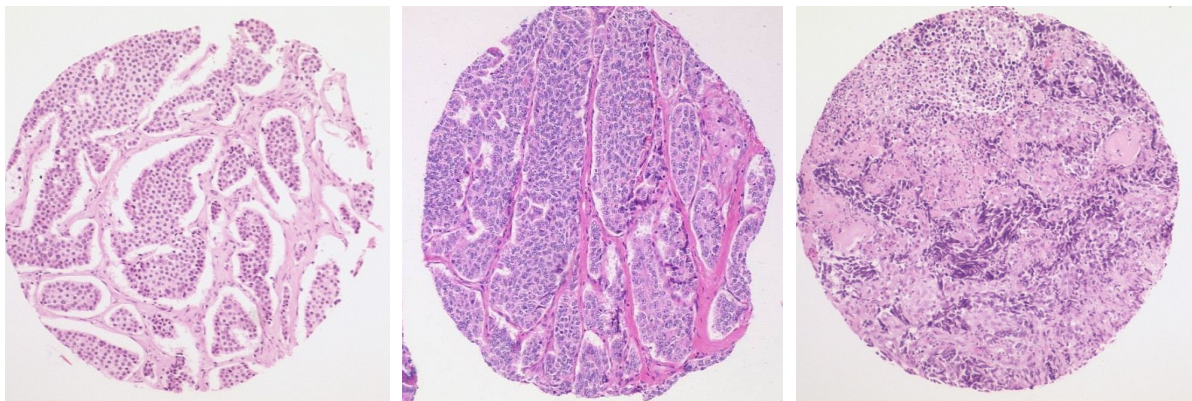
| WHO 1980   | WHO 2000  | WHO 2010   |
|--|---|--|
| I. Karzinoid   | 1. Gut differenzierter Endokriner Tumor                                 | 1. Neuroendokriner Tumor (NET) G1 (Karzinoid)              |
|  | 2. Gut differenziertes endokrines Karzinom                              | 2. NET G2*   |
|  | 3. Schlecht differenziertes Endokrines Karzinom /kleinzelliges Karzinom | 3. Neuroendokrines Karzinom (NEC) G3-Groß oder kleinzellig |
| II. Mukokarzinoid  | 4. Gemischtes exokrin-endokrines Karzinom                               | 4. Gemischtes adeno-neuroendokrines Karzinom               |
| III. Gemischte Form<br>Karzinoid-Adenokarzinom   |   |  |
| IV. Pseudeotumoröse Läsionen   | 5. Tumor-artige Läsionen  | 5. Hyperplastische und präneoplastische Läsionen           |
| G, proliferationsbasiertes Grading; NET, neuroendokriner Tumor; NEC, neuroendokrines Karzinom; |   |  |

\*Im seltenen Falle eines NET mit einem Ki67/MIB1) Proliferationsindex über 20% erhält dieser gut differenzierte Tumor den Grad „G3“.

(modifiziert nach Anlauf et al. 2011 und Anlauf et al. 2010)

Bis vor einigen Jahren war kein offizielles TNM-basiertes Staging-System für NET vorhanden (Klimstra et al. 2010). Mit dem Erscheinen der 7. Auflage der UICC (International Union against Cancer)-TNM-Klassifikation der wichtigsten bösartigen Tumoren (UICC 2009) entstand eine schwierige Situation, da neben dieser Klassifikation noch eine von ENETS (2006 und 2007) vorgeschlagene TNM-Klassifikation vorlag, die beide nur bedingt deckungsgleich waren (Anlauf et al. 2010, Anlauf et al. 2011).

Die ENETS-Klassifikation wurde inzwischen speziell für die Vorderdarmtumoren, insbesondere für die Pankreas-NEN validiert. Die 2009 erschienene UICC-Klassifikation folgt in großen Teilen der bekannten ENETS-Klassifikation, weicht jedoch bei den TNM-Klassifikationen der Appendix- und Pankreas NEN ab, was große Probleme aufwirft, da die ENETS-TNM-Klassifikation der Pankreas NEN bereits validiert ist. Deshalb ist für diese Lokalisationen eine parallele Anwendung von ENETS- und UICC-TNM-Klassifikation nicht zu vermeiden (Anlauf et al. 2011).



**Abbildung 1:** (A) gut differenzierter neuroendokriner Tumor (NET G1 nach WHO-Klassifikation) (B) gut differenziertes neuroendokrines Karzinom (WHO NET G2) (C) schlecht differenziertes neuroendokrines Karzinom (WHO NEC G3), 50fache Vergrößerung (*Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Jena*)

### **3. Ziele der Arbeit**

Das Erstellen von genomweiten Expressionsprofilen hat eine Anzahl von Genen identifiziert, die eine vermehrte Expression in gastro-entero-pankreatischen neuroendokrinen Tumoren aufweisen.

Die Ziele dieser Arbeit waren:

- 1) diese Gene auch auf Proteinebene zu validieren
- 2) die Expression mit klinisch-pathologischen Parametern zu korrelieren
- 3) aktivierende Mutationen durch Analyse von Tumoren mit hoher Expression zu identifizieren, die als Ansatzpunkt für eine Therapie durch Inhibition der Tyrosinkinase geeignet wäre.

Die Untersuchungen wurden anhand der neuen, international standardisierten WHO-Klassifikationen durchgeführt.

## **4. Material und Methode**

### **4.1. Tumorkollektiv**

Die Gewebeproben dieser Arbeit entstammen dem Tumorkollektiv des Institutes für Pathologie des Universitätsklinikums Jena. Sie beinhalten Tumorgewebe des Ösophagus, des Magens, der Gallenblase, des Ileums, des Duodenums, der Appendix, des Rektums, des Pankreas sowie Metastasen. Die Verteilung der Tumoren auf die einzelnen Lokalisationen ist in Tabelle 2 zusammengefasst. Das GEP-NET Kollektiv umfasst 131 Proben von 119 Patienten. 97 Proben stammen von Primärtumoren und 34 von Metastasen. Bei 10 Patienten waren sowohl Proben vom Primärtumor, als auch von Metastasen vorhanden.

Von den 119 Patienten waren 55 (46,2%) Patienten weiblich und 64 (53,8%) männlich. Die Altersverteilung lag zwischen dem 19. und 87. Lebensjahr, wobei das mittlere Lebensalter 58 Jahre betrug.

Der Durchmesser der Tumoren reichte von 1 cm bis zu 13 cm mit einer mittleren Größe von 3 cm.

Bei allen Tumoren wurde zur Bestätigung der Diagnose die Histologie überprüft. Zusätzlich wurden alle Schnitte mit Chromogranin A, Synaptophysin und Ki67 angefärbt. Die Einteilung der Proben erfolgte nach dem neuen WHO Klassifikationsschema aus dem Jahr 2010: Gut differenzierter neuroendokriner Tumor, NET G1 (geringgradig), NET G2 (mittelgradig) und schlecht differenziertes neuroendokrines Karzinom NEC G3 (hochgradig) mit großzelligen NEC oder kleinzelligen NEC (Bosman et al. 2010, Massironi et al. 2008, Rindi et al. 2006)

## **4.2 Gewebe-Array-Verfahren**

Zur erleichterten und schnelleren Auswertung der Gewebeschnitte wurde ein Gewebe-Micro-Array (tissue-micro-array, TMA) angefertigt (Knösel et al. 2006, Knösel et al. 2005).

Aus den in Paraffin eingebetteten Gewebeproben wurde mittels Gewebe-Array-Stanzgerät jeweils ein im Durchmesser 0,6 mm großer Zylinder eines repräsentativen Tumoreals ausgestanzt. Im Empfängerblock, der ebenfalls aus Paraffin besteht, wurde ein ebenso großer Zylinder entfernt, in den die Gewebeprobe eingebracht wurde. Von diesem TMA-Paraffinblock wurden Serienschnitte angefertigt, die anschließend auf Objektträger aufgebracht wurden und mit den jeweiligen Markern angefärbt werden konnten.

## **4.3 Immunhistochemie**

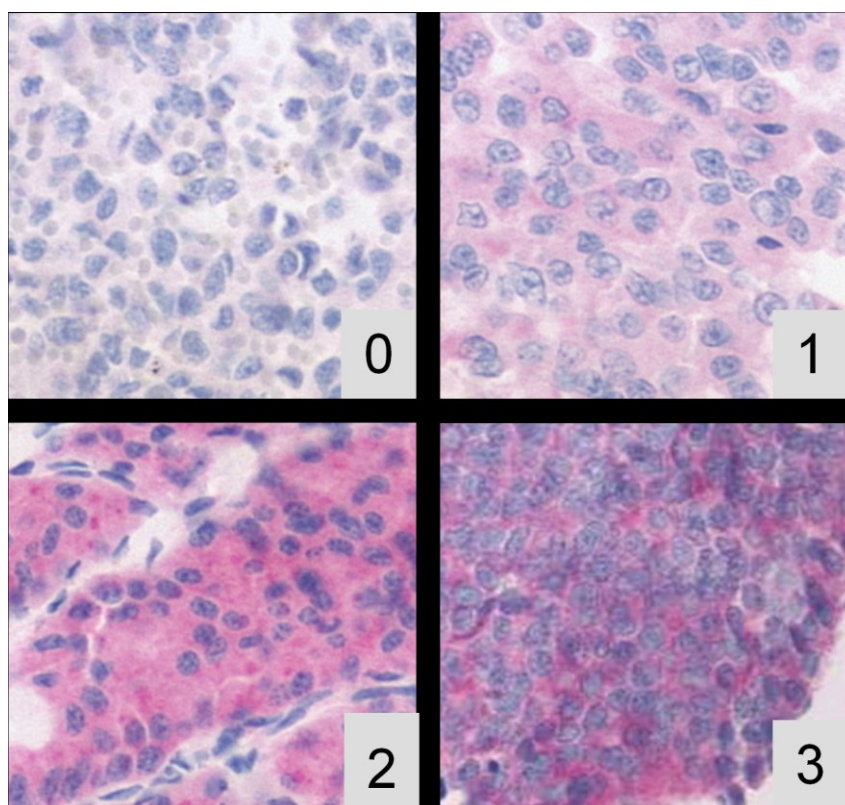
Für die immunhistochemische Analyse wurden kommerziell verfügbare Antikörper gegen KIT, PDGFRA, CK19, CK7, CK20, S100, CD46, Chromogranin A und Ki67 verwendet (Tabelle 2). Die immunhistochemische Anfärbung wurde nach den Standardverfahren durchgeführt. Die Vorbehandlung der Objektträger erfolgte durch Kochen oder proteolytische Enzyme wie in Tabelle 3 aufgeführt mit anschließender Inkubation mit den Antikörpern. Danach erfolgte der Antikörpernachweis mithilfe eines biotinylierten Anti-Maus Sekundärantikörpers und dem multilink-Biotin-Streptavidin-verstärkten Nachweissystem (Biogenex, San Ramon, CA). Die Anfärbung wurde mittels eines Fastred-Chromogensystems (DAKO, Hamburg, Deutschland) sichtbar gemacht.

Die Expressionen wurde anhand einer 4-Stufen-Skala eingeschätzt (0-negativ, 1-schwach, 2-moderat, 3-stark positiv) (Abbildung 2). Diese wurde auf ein 2-Stufen-System reduziert, wobei 0/1 als negativ und 2/3 als positiv gewertet wurde. So wurde eine unabhängig durchgeführte statistische Analyse der einzelnen Proteine und ihrer Korrelation mit den klinisch-pathologischen Parametern einschließlich des Überlebens möglich.

Die Proliferation wurde anhand des Ki67-Index in Prozent beurteilt.

**Tabelle 2**     Antikörper für Immunhistochemie

| <b>Antigen</b> | <b>Produkt Nr.</b> | <b>Hersteller</b> | <b>Verdünnung</b> | <b>Vorbehandlung</b> |
|----------------|--------------------|-------------------|-------------------|----------------------|
| cKIT           | A4502              | DAKO              | 1:200             | Kochen               |
| PDGFRA         | P1721C01           | DCS               | 1:200             | Kochen               |
| CK19           | M0888              | DAKO              | 1:300             | Prot. enzyme         |
| CK7            | M7018              | DAKO              | 1:750             | Kochen               |
| S100           | Z0311              | DAKO              | 1:8000            | Prot. enzyme         |
| CD56           | NCLCD561B6         | Novocastra        | 1:500             | Kochen               |
| ChrgrA         | M0869              | DAKO              | 1:500             | Kochen               |
| Synaptophysin  | MU383UC            | BioGenex          | 1:200             | Kochen               |
| Ki67           | M7240              | DAKO              | 1:1000            | Kochen               |



**Abbildung 2:** KIT Immunfärbung mit negativer (0), schwacher (1), moderater (2) und starker (3) Expression, 50fache Vergrößerung (*Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Jena*)



#### 4.4 Mutationsanalyse von KIT und PDGFRA

Die Mutationsanalyse wurde von Institut für Pathologie der Friedrich Schiller Universität Jena durchgeführt, welches eines der zertifizierten Labore für KIT und K-RAS Mutationsanalyse in Deutschland ist. Bei 56 Patientenproben zeigte sich eine Überexpression von KIT oder PDGFRA, die den Klassen 2 und 3 zuzuordnen waren. Aus diesen in Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebeproben wurde genomische DNA mit Hilfe eines QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Deutschland) isoliert. Zweihundert Nanogramm (200ng) der genomischen DNA wurden einer PCR Amplifikation unterzogen unter Nutzung der Hot Taq DNA Polymerase (PeQlab, Deutschland) mit der Primärsequenz:

KIT Exon 9: 5'-ATTTATTTTCCTAGAGTAAGCCAGGG-3' (Sense) und 5'-ATCATGACTGATATGGTAGACAGAGC-3' (Antisense)

KIT Exon 11: 5'-CATGATGTGCATTATTGTGAT-3' (Sense) und 5'-ACTGTTATGTGTACCCAAAAAG-3' (Antisense)

KIT Exon 13: 50-CACCATCACCACTTACTTGTTGTCT-30 (Sense) und 50-GACAGACAATAAAAGGCAGCTTGGAC-30 (Antisense)

KIT Exon 17: 50-TGAACATCATTCAAGGCGTACTTTTG-30 (Sense) und 50-TTGAAACTAAAAATCCTTTGCAGGAC-30 (Antisense)

PDGFRA Exon 12: 5'-CCAGTTACCTGTCCTGGTCAT-3' (Sense) und 5'-GGAGGTTACCCCATGGAAGT-3' (Antisense)

PDGFRA Exon 18: 5'-AGTGTGTCCACCGTGATCTG-3' (Sense) und 5'-GACCCCTTGAAATCTATTGATG-3' (Antisense)

Der PCR-Prozess bestand aus 40 Zyklen, bei denen zuerst ein Erhitzen auf 95°C für 1 Minute erfolgte, anschließend wurde auf die jeweils nötige Hybridisierungstemperatur abgekühlt, die 65°C für KIT Exon 9, 50°C für KIT Exon 11 und 55°C für PDGFRA Exon 12 und 18 beträgt. Als Abschluss der Zyklus wurde für 45 Sekunden auf 72°C erwärmt.

Die PCR-Produkte wurden mit einem DNA Reinigungskit (DNA clean & concentration kit, Zyme Research) gereinigt und für die direkte Sequenzierung basierend auf einer kapillären DNA Elektrophorese (Agowa) in beide Richtungen angewendet. Jede Sequenz wurde mit einer Nukleotidsequenz humaner Gene der NCBI verglichen und

mit einer NCBI Standard Nukleotid Kontrollsuche, einem sogenannten „Blast“, überprüft, um festzustellen, ob in einem einzelnen Exon Mutationen vorhanden sind.

#### **4.5 Statistische Methodik**

Um die Stärke der Assoziation zwischen den untersuchten Parametern festzustellen wurde der Fisher's-Exact Test angewandt. Als signifikant wurde ein Messwert von  $p \leq 0,05$  festgelegt. Alle Berechnungen wurden an einem PC mit Hilfe der statistischen Software SPSS (Version 15, München, Deutschland) durchgeführt. Die klinisch-pathologischen Parameter einschließlich der Nachsorge waren für alle Patienten vorhanden. Der Überwachungszeitraum der noch lebenden Patienten betrug im Mittel 75 Monate. Um nur das krankheitsspezifische Überleben zu erkennen wurden ausschließlich die Todesfälle gezählt, die Folge der neuroendokrinen Tumoren waren. Patienten, die aufgrund anderer Ursachen verstarben wurden zum Todeszeitpunkt zensiert. Die Differenzen der Überlebenskurven nach Kaplan-Meier wurden nach einer statistischen Signifikanz mit einem Log-Rang-Test überprüft. Multivariate Analysen wurden mit dem Proportionalen Hazard Modell (Cox Regression) durchgeführt. Mittels schrittweiser Vorwärts-Prozeduren unterstützt durch die SPSS Software wurde die Zahl der Variablen im Cox-Modell reduziert. Für die Einbeziehung der Variablen wurde ein Signifikanzlevel von 0,05 festgelegt und für den Ausschluss der Variablen ein Signifikanzlevel von 0,1.

## **5. Ergebnisse**

### **5.1 Klinisch-pathologische Untersuchungsergebnisse**

Die Verteilung der Tumoren auf die einzelnen Lokalisationen ist in Tabelle 3 zusammengefasst. Das Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose reichte von 19 Jahren bis 87 Jahren (Mittleres Alter 58 Jahre, weiblich n = 55, männlich n = 64). Eine Tumorgroße von 1 bis 13 cm war zu beobachten, wobei die mittlere Größe 3 cm betrug. Lediglich bei einem Patienten wurde ein MEN 1 Syndrom diagnostiziert. Von 103 Patienten erfolgte in 80 Fällen eine Resektion des Primärtumors resultierend in einer R0-Resektion. Entsprechend des WHO Gratings wiesen 29 Patienten ein NEC G3 (schlecht differenziertes Karzinom, hochgradig), 55 Patienten NET G2 (gut differenziertes Karzinom, mittelgradig) und 35 Patienten NET G1 (gut differenzierter Tumor, geringgradig) auf. Alle Patienten hatten regelmäßige Nachsorgeuntersuchungen, hauptsächlich bei den jeweiligen Hausärzten. Zum Zeitpunkt der letzten Nachuntersuchung waren 61 Patienten am Leben und 58 verstorben. Todesursache war bei 45 Fällen der neuroendokrine Tumor, in 5 Fällen andere Karzinome und 8 Patienten verstarben an Krankheiten, die nicht auf ein tumoröses Geschehen zurückzuführen waren.

**Tabelle 3** Anatomische Lokalisation der GEP-NET, 119 Patienten

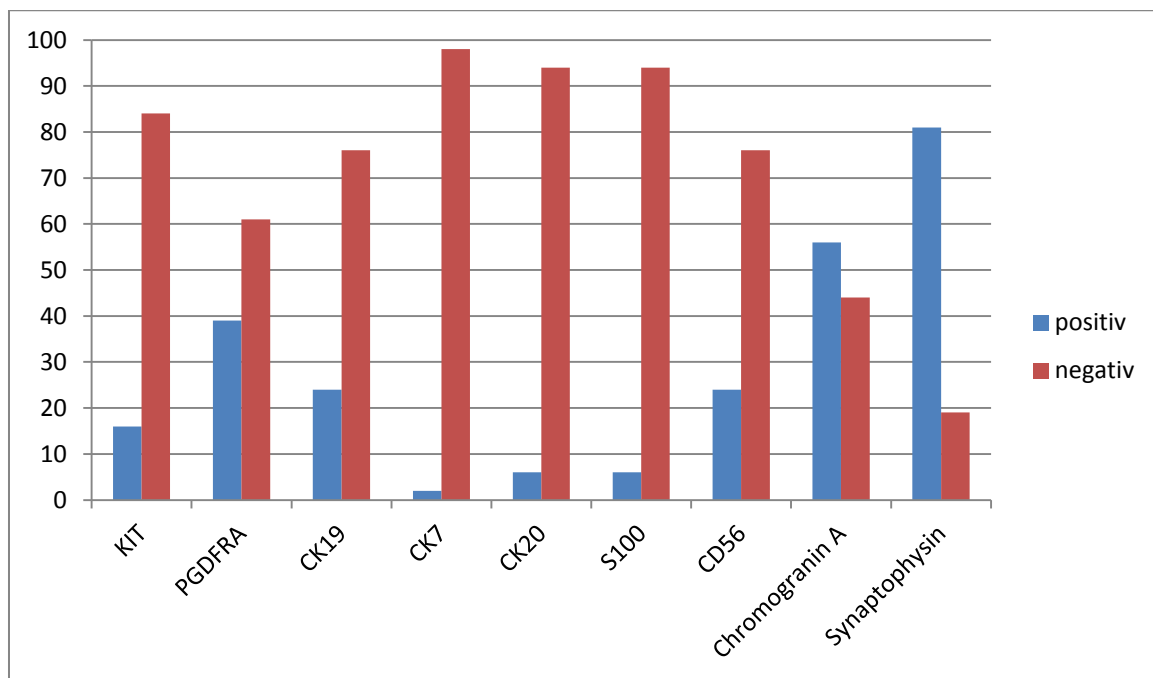
| <b>Anatomische Lokalisation</b> | <b>Anzahl der Fälle</b> |
|---------------------------------|-------------------------|
| Gastrointestinum                | 65 (55%)                |
| Ösophagus                       | 1                       |
| Magen                           | 6                       |
| Dünndarm                        | 31 (31%)                |
| Kolon und Rektum                | 27 (23%)                |
| Pankreas                        | 44 (37%)                |
| Gallenblase                     | 2                       |
| Gallendgang                     | 1                       |
| Andere*                         | 7                       |
| Total                           | 119 (100%)              |

\*6 Lebermetastasen und eine Lymphknotenmetastase mit unbekanntem Primärtumor nach Probelaparotomie und ausführlichen diagnostischen Verfahren einschließlich <sup>68</sup>GA-DOTATOC PET

## 5.2 Immunhistochemie

Die Ergebnisse des gesamten Tumorkollektives und aller Antikörper sind in Tabelle 4 zusammengefasst und in Diagramm 2 grafisch dargestellt. Eine hohe Expression von KIT war in 16% aller ausgewerteten Fälle zu beobachten (Stufe 2/3, 20/125). Bei PDGFR zeigte sich in 39% der Proben eine hohe Expression (48/122), bei CK19 in 24% (29/119), bei CK7 in 2% (2/124), bei CK20 in 6% (7/123), bei S100 in 6% (7/124), bei CD56 in 24% (29/123), bei Chromogranin A in 56% (70/125) und bei Synaptophysin in 81% (101/125). Der Proliferationsindex Ki67 zeigte eine Ausprägung zwischen 0% und 70%.

*Diagramm 2: Grafische Darstellung der immunhistochemischen Ergebnisse*



*Tabelle 4* Zusammenfassung aller immunhistochemischen Ergebnisse der GEP-NET

| Antikörper     | n   | positiv   | negativ   |
|----------------|-----|-----------|-----------|
| KIT            | 125 | 20 (16%)  | 105 (84%) |
| PDGFRA         | 122 | 48 (39%)  | 74 (61%)  |
| CK19           | 119 | 29 (24%)  | 90 (76%)  |
| CK7            | 124 | 2 (2%)    | 122 (98%) |
| CK20           | 123 | 7 (6%)    | 116 (94%) |
| S100           | 124 | 7 (6%)    | 117 (94%) |
| CD56           | 123 | 29 (24%)  | 94 (76%)  |
| Chromogranin A | 125 | 70 (56%)  | 55 (44%)  |
| Synapthophysin | 125 | 101 (81%) | 24 (19%)  |

### **5.3 Korrelation von klinisch-pathologischen Parametern**

Bei der Untersuchung des Zusammenhangs zwischen der KIT und der PDGFRA Expression war zu sehen, dass in 95% ( $p < 0,001$ ) eine Coexpression von hohem KIT und hohem PDGFRA vorlag. Diese hohe KIT/PDGFRA Expression war statistisch signifikant mit Tumormetastasen korreliert ( $p < 0,001$ ). Weiterhin wurde ersichtlich, dass eine hohe Expression von KIT und PDGFRA mit einem höheren WHO Grading einhergehen: Eine hohe KIT Expression zeigte sich bei Grad 1 in 9%, bei Grad 2 in 13% und bei Grad 3 in 28% ( $p = 0,0084$ ). Bei PDGFRA lag bei Grad 1 in 21%, bei Grad 2 in 43% und bei Grad 3 in 49% ( $p = 0,054$ ) eine hohen Expression vor.

Der sensibelste neuroendokrine Marker dieses Tumorkollektivs war Synaptophysin, welches in 81 % aller GEP NET zu ermitteln war. Im Vergleich von pankreatischen endokrinen Tumoren mit gastroenteralen endokrinen Tumoren korrelierte eine hohe Expression von CK19 mit gastroenteralen endokrinen Tumoren (33%,  $p = 0,039$ ). Eine weitere signifikante Korrelation mit Proteinexpression konnte nicht nachgewiesen werden.

### **5.4 Überlebensanalyse**

#### **5.4.1 Univariate Überlebensanalyse**

Ziel der Untersuchung war es, die Ergebnisse der Patientenüberwachung der letzten 10 Jahre mit den immunhistochemischen Ergebnissen in Beziehung zu setzen.

Das krankheitsspezifische Überleben wurde wie zu erwarten von WHO Grad und der Radikalität der chirurgischen Behandlung (R-Status) statistisch signifikant beeinflusst (Fig. 2A). Zusätzlich zeigte sich, dass eine hohe Expression von KIT statistisch signifikant mit einem kürzeren Überleben der Patienten korreliert war ( $p = 0,003$ , Fig. 2B). In 131 Proben von 108 verschiedenen Patienten war eine PDGFRA Expression nachweisbar. Bei 36 (33%) Patienten zeigte sich eine Überexpression von PDGFRA. Auch bei PDGFRA hatten Patienten mit hoher Expression signifikant kürzere Überlebensraten als Patienten mit geringer Expression ( $p = 0,018$ , Fig. 2C).



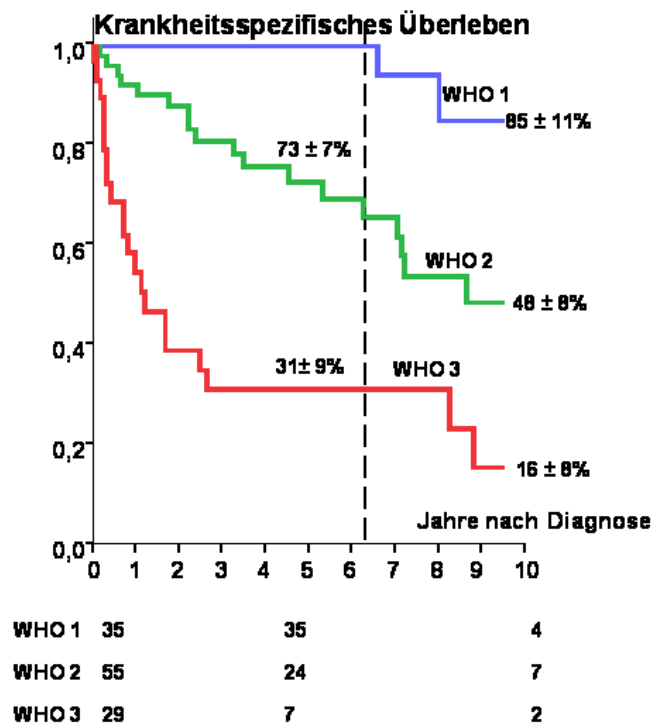


Abbildung 2A: Kaplan - Meier Kurve für den Vergleich von Patientenüberleben mit WHO Grad 1, 2 und 3,  $p=0,008$

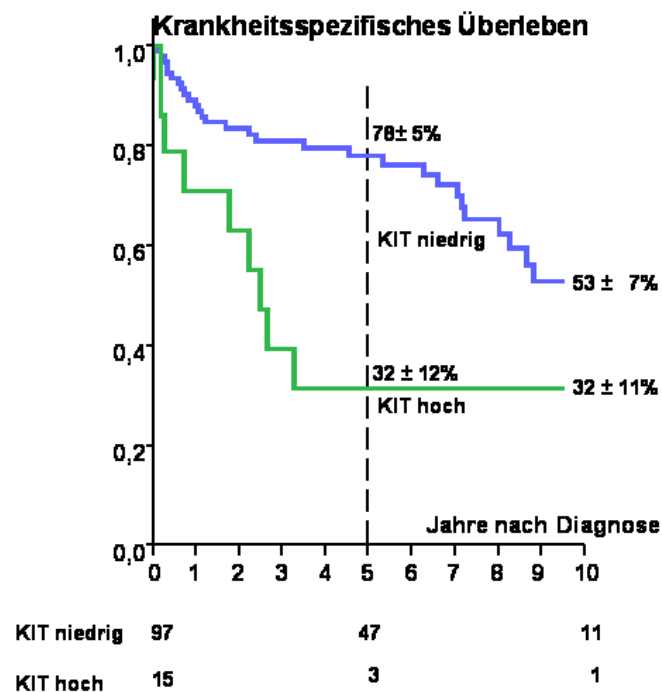
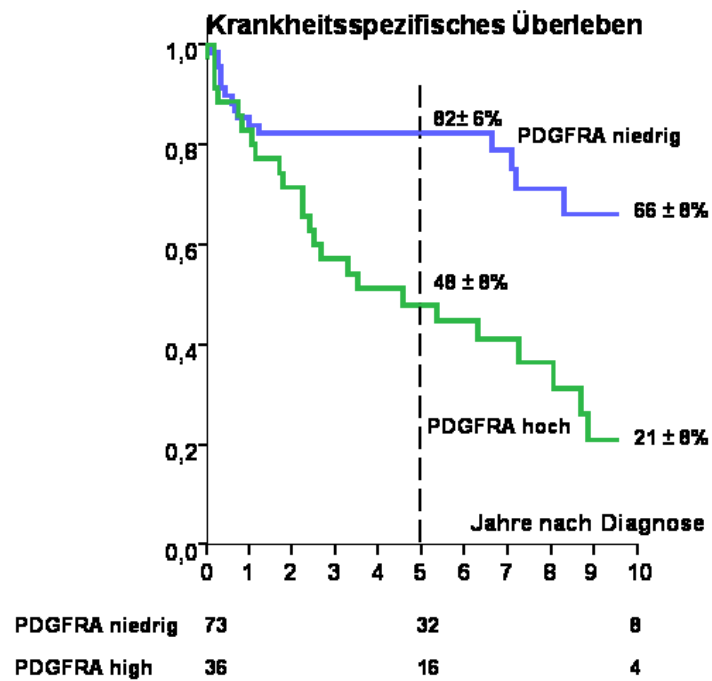


Abbildung 2B: Kaplan - Meier Kurve für den Vergleich von Patientenüberleben mit Tumoren mit niedriger und hoher KIT Expression,  $p=0,003$ .



*Abbildung 2C:* Kaplan - Meier Kurve für den Vergleich von Patientenüberleben mit Tumoren mit niedriger und hoher PDGFRA Expression,  $p = 0,018$ .

### 5.4.2 Multivariate Überlebensanalyse

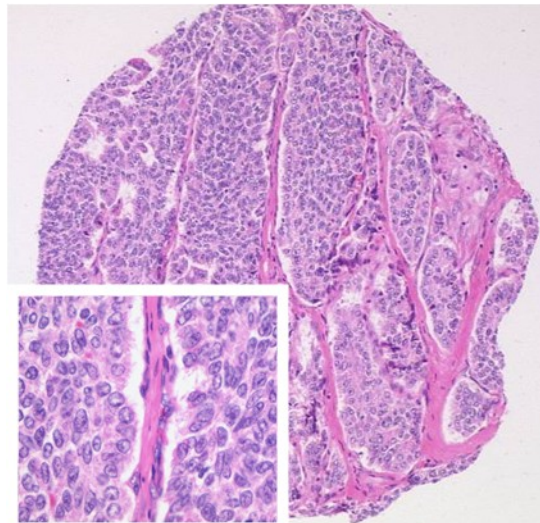
Alle Faktoren die bei der univariaten Analyse einen statistisch signifikanten Einfluss auf das krankheitsspezifische Überleben zeigten, z.B. PDGFRA, KIT, WHO Grad und Radikalität der chirurgischen Behandlung wurden in ein Proportionales Hazard Modell nach COX eingefügt. PDGFRA, WHO Grad und Radikalität der chirurgischen Behandlung bewiesen sich als unabhängige Einflussfaktoren auf das krankheitsspezifische Überleben (Tabelle 5)

*Tabelle 4*     Multivariate Analyse des krankheitsbedingten Überleben für 119 Patienten

| <b>Faktor</b>                  | <b>p</b> | <b>Hazard Ratio</b> | <b>95% Konfidenzintervall</b> |
|--------------------------------|----------|---------------------|-------------------------------|
| <b>PDGFRA</b>                  |          |                     |                               |
| Niedrig vs. hoch               | 0.032    | 2.197               | 1.071-4.505                   |
| <b>Chirurgische Behandlung</b> |          |                     |                               |
| (R0 Resektion vs. andere)      | 0.001    | 3.851               | 1.782-8.325                   |
| <b>WHO Grading</b>             |          |                     |                               |
| Grad 1 / 2 vs. Grad 3          | 0.008    | 2.547               | 1.281-5.063                   |

## 5.5 Mutationsanalyse der GEP NET

Für alle Proben mit einer hohen Expression (Stufe 2/3) von KIT und/oder PDGFRA wurde eine Mutationsanalyse durchgeführt. Dabei wurden 15 Proben nach KIT (Exon 9, 11, 13 und 17) und 36 nach PDGFRA (Exon 12 und 18) Mutationen analysiert. Dabei wurde eine neue Mutation in Exon 11 des KIT Gens in einer Lebermetastase eines Pankreastumors identifiziert: K558N\_V559insP (Abbildung 3). Um dies zu bestätigen wurde ein anderer Tumorblock des gleichen Patienten ausgesucht und die Analyse wiederholt. Es stellte sich das gleiche Mutationsmuster von K558N\_V559insP heraus. Dieser Tumor war positiv für KIT (2+) und PDGFRA (2+). Die Probe stammte von einer 5 cm großen Lebermetastase eines gut differenzierten neuroendokrinen Karzinoms des Pankreas eines 55 jährigen Patienten. Der Patient verstarb an dem Fortschreiten der Tumorerkrankung 41 Monate nach der ersten Operation mit Leber- und Peritonealmetastasen. Er bekam vorher keine Chemotherapie oder zielgerichtete Therapie. Keiner der anderen Tumoren mit einer Überexpression von KIT und PDGFRA wies Mutationen in KIT oder PDGFRA an den bekannten Hotspots auf.



*Abbildung 3: metastasierendes gut differenziertes pankreatisches neuroendokrines Karzinom mit K558N\_V559insP Mutation (WHO NET G2), 50fache Vergrößerung (Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Jena)*

## 6. Diskussion

Die Entwicklung von neuen sogenannten zielgerichteten therapeutischen Wirkstoffen die speziell auf die molekularen Strukturen, die entscheidend für die Tumorgenese sind, abzielen, hat einen enormen Einfluss auf das Management von Krebspatienten. Die erfolgreiche Behandlung von fortgeschrittenen GISTs mit Rezeptortyrosinkinase (RTK) Inhibitoren hat die Hoffnung geweckt, dass andere bösartige Tumoren von einer ähnlichen Behandlung profitieren können (Akintola-Ogunremi et al. 2003, Antonescu et al. 2009, Berretina et al. 2010). Zuverlässige voraussagbare Biomarker werden dringend benötigt. In dieser Studie wurde demonstriert, dass KIT und PDGFRA signifikant mit einem kürzeren Überleben der Patienten mit GEP NET korrelieren und assoziiert sind mit dem Fortschreiten des Tumors und dem Vorhandensein von Metastasen. Zusätzlich konnte eine neuartige, aktivierende Mutation identifiziert werden, die für die Anwendung der RTK Inhibitionstherapie in metastasierenden pankreatischen neuroendokrinen Karzinomen möglicherweise geeignet sein könnte.

Dies ist die erste umfangreiche und größte Studie von GEP NET einer einzelnen Institution nach dem gegenwärtigen WHO (2010) Gradingssystem mit Biomarkern, die mit klinisch-pathologischen Parametern einschließlich des 10-Jahres Überlebens korreliert wurde. Außerdem wurden bei 68 Proben dieser seltenen Neoplasie Mutationsanalysen durchgeführt. Die Tatsache, dass mit dieser Arbeit verschiedene Expressionsmuster bestätigt werden konnten, von denen bereits in vorangegangenen Untersuchungen an anderen Untergruppen dieser seltenen Neoplasie berichtet wurde, unterstützt die Aussagekraft dieser Ergebnisse (Micke et al. 2004, Kartha et al. 2008, Rossi et al. 2005).

In unserer Studie wurde in 15 von 112 Fälle (13%) eine hohe Expression von KIT beobachtet. Dies ist eine geringere Zahl positiver Fälle, als zuvor in neuroendokrinen Karzinomen der Haut in Merkel-Zell-Karzinomen (62%) berichtet wurde (Andea et al. 2010). Ursache dafür kann sein, dass unser Tumorkollektiv nicht ausschließlich schlecht differenzierte Karzinome (WHO Grad 3) sondern auch gut differenzierte Karzinome (WHO Grad 2) und gut differenzierte neuroendokrine Tumoren (WHO Grad 1) enthielt. In unserer Studie war festzustellen, dass eine hohe Expression von KIT mit einem höheren WHO Grad assoziiert ist. Diese Besonderheit zeigte sich

auch bereits bei Zhang et al. 2009. So zeigten die GEP NETs mit Grad 1 in 9% eine hohe Expression von KIT, während es bei Grad 2 schon 14% waren und bei Grad 3 sogar 28% aller Tumoren. Bei der Expression von PDGFRA verhielt es sich ähnlich. In 36% aller untersuchten Fälle war eine PDGFRA Expression zu beobachten. Auch hier zeigte sich eine steigende Expression mit höherem WHO Grad. So lag die Expression bei Grad 1 bei 15%, bei Grad 2 bei 42% und bei Grad 3 bei 50%. Kartha et al. hat in Merkelzellkarzinomen, einem Subtyp von schlecht differenzierten neuroendokrinen Karzinomen der Haut, ebenfalls eine höhere Inzidenz von PGFRA (87%) nachgewiesen. Dies zeigt, dass eine hohe Expression von PGFRA in schlecht differenzierten Tumoren keine seltenes molekulares Ereignis ist (Kartha et al. 2008). Desweiteren konnten wir eine Coexpression von hoher KIT und hoher PGFRA Expression in 95% ( $p < 0,001$ ) des gesamten Tumorkollektivs nachweisen. Auffällig war außerdem, dass eine hohe KIT/PDGFRA Expression signifikant mit Metastasen korrelierte ( $p < 0,001$ )

In unseren Untersuchungen war der empfindlichste Marker Synaptophysin, der sich in 81% des Tumorkollektivs aller GEP NET zeigte. Eine hohe Expression von Cytokeratin 19 war statistisch signifikant korreliert mit gastroenteralen neuroendokrinen Tumoren (33%,  $p = 0,039$ ). Bei pankreatischen neuroendokrinen Tumoren war Cytokeratin 19 nur in 12% der Fälle nachzuweisen, was auf eine unterschiedliche Biologie der Tumorprogression hindeutet.

Unseres Wissens nach ist dies die erste Studie, die zeigt, dass eine hohe KIT und PDGFRA Expression signifikant mit einer kürzeren Überlebensdauer der Patienten mit GEP NET korreliert ist ( $p < 0,01$ ). Interessanterweise stimmen unsere Ergebnisse mit Beobachtungen bei Merkelzellkarzinomen (Andea et al. 2010), kolorektalen neuroendokrinen Karzinomen (Akintola-Ogunremi et al. 2003) und squamösen Lungenkarzinomen (Micke et al. 2004) überein. Bei Merkelzellkarzinomen und kolorektalen neuroendokrinen Karzinomen zeigt sich lediglich die Tendenz zu einem kürzeren Überleben, während bei letztgenanntem squamösem Lungenkarzinom eine signifikante Ausprägung vorliegt. Auch bei pankreatischen neuroendokrinen Tumoren war bereits in anderen Untersuchungen eine signifikante Assoziation zwischen der KIT Expression und einer erhöhten Aggressivität und kürzerer Überlebenszeit der Patienten beobachtet worden (Corbo et al. 2011).

Bei Betrachtung der Überlebenskurven der einzelnen WHO Gratings zeigte sich wie zu erwarten eine statistisch signifikante Unterteilung der Patienten mit kürzerem Überleben in Grad 3 (schlecht differenziert), Grad 2 (gut differenzierte Karzinome) und Grad 1 (gut differenzierter Tumor). Dies bekräftigt dieses Gratingsystem für weitere Studien. In unserer statistischen multivarianten Analyse war kein direkter Zusammenhang zwischen dem WHO Grading, der Radikalität der chirurgischen Behandlung und einer hohen PDGFRA Expression festzustellen. Dies sind unabhängige Faktoren, die mit einer kürzeren Überlebenszeit der Patienten korrelieren.

Unsere Mutationsanalyse beschränkte sich auf die üblicherweise mutierten Exone. Bei KIT waren dies Exon 9, 11, 13 und 17 und bei PDGFRA die Exone 12 und 18. Dabei war es uns möglich, durch die Mutationsanalyse eine neue Mutation im Exon 11 in dem KIT Gen festzustellen: K558N\_V559insP. Diese Mutation fand sich in einem metastasierenden Pankreaskarzinom (3% aller 35 pankreatischen Primärtumoren und 12% von 6 metastasierenden Pankreaskarzinomen).

Diese Mutation ist in dem kodierenden Teil der intrazellulären Juxtamembranregion lokalisiert. Somit führt sie zu einer konstitutiven, ligandenunabhängigen Aktivierung der Rezeptortyrosinkinaseaktivität, die wachstumsförderndes Verhalten und antiapoptotische Signale für die Tumorzellen unterstützt (Antonescu et al. 2007, Antonescu et al. 2009). Auf der Proteinebene des Tumors zeigte sich eine Positivität für KIT und PDGFRA. Die klinische Relevanz dieses Mutationsmusters bei Patienten mit neuroendokrinen Pankreastumoren wurde bisher noch nicht erläutert. Nichtsdestotrotz könnte diese Mutation ein prädiktiver Marker für die Rezeptor-Tyrosinkinase Inhibitionstherapie sein, aufgrund der Tatsache, dass Mutationen dieser Region aktivierende Mutationen bei GIST sind. Eine Untergruppe von Tumoren könnte auf die Rezeptor-Tyrosinkinase Inhibitionstherapie bei metastasierenden neuroendokrinen Pankreastumoren ansprechen. Es werden weitere Studien benötigt, um die funktionelle Rolle der KIT Mutationen in neuroendokrinen Tumoren zu erforschen. Die Therapie mit speziellen Inhibitoren für gezielte Kinasen könnte bei fortgeschrittenen/metastasierenden Fällen in Betracht gezogen werden. Interessanterweise berichtete erst kürzlich Corbo et al. von 6 verschiedenen Mutationen, die Einfluss auf 5 Kinasegene in pankreatischen

neuroendokrinen Tumoren haben. Unsere Mutation fand sich in der katalytischen Domäne von KIT. Deshalb wird eine weitere experimentelle Evaluation benötigt um die funktionelle Signifikanz einschätzen zu können (Corbo et al. 2011)

Eine andere Gruppe sequenzierte 10 nicht familiäre pankreatische neuroendokrine Tumoren und konnte keine Mutationen der KIT Genes nachweisen (Jiao et al. 2011). Allerdings wurde in diesen Fällen die KIT Proteinexpression nicht bewertet.

Zhang et al. analysierten 21 pankreatische neuroendokrine Tumoren und fanden keine KIT Mutationen (Exon 9 und 11) obwohl sie ihr Tumorkollektiv zuvor auf hohe KIT Expression überprüft hatten (Zhang et al. 2009). Interessanterweise beschreiben die Autoren eine hohe KIT Expression als prognostischen Marker für ein kürzeres Überleben der Patienten, was unserer Ergebnisse bekräftigt.

Alle Ergebnisse könnten darauf hindeuten, dass KIT Mutationen in den analysierten Hotspots seltene Ereignisse sind. Jedoch könnten andere Hotspots für eine hohe Proteinexpression in einer Untergruppe dieser Tumoren verantwortlich sein. Nichtsdestotrotz zeigte sich in „in vitro“ Untersuchungen, dass Imatinibmesylat (Gleevec) einen zytotoxischen Effekt auf eine pankreatische neuroendokrine Zelllinie BON-1 hat (Yoa et al. 2007). Klinische Studien zeigten, dass Sunitinib Malate (Sutent), ein oraler Tyrosinkinaseinhibitor, eine Anti-Tumor Aktivität bei pankreatischen neuroendokrinen Tumoren hatte (Kulke et al. 2011). Weitere klinische Studien unter Berücksichtigung des Mutationsstatus einzelner Tyrosinkinasen wären wünschenswert.



## 7. Zusammenfassung

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass das aktuelle Gradingssystem der WHO eine prognostische Bedeutung für das Überleben der Patienten aufweist und für weitere Studien zu empfehlen ist. Desweiteren waren hohe Proteinexpressionen von KIT und PDGFRA signifikant assoziiert mit einem kürzerem Überleben der Patienten und einem erhöhtem Auftreten von Metastasen bei GEP NET. Beide könnten also als prognostische Biomarker dienen.

Zusätzlich war es uns möglich eine neuartige Mutation bei einem pankreatischen neuroendokrinen Tumor zu identifizieren, der offensichtlich sensibel für Imatinibmesylat ist. Diese Tatsache eröffnet neue Wege für die Rezeptor-Tyrosinkinase Inhibitionstherapie bei fortgeschrittenen metastasierenden neuroendokrinen Tumoren des Pankreas. Weitere Studien sind jedoch notwendig.

Diese Studie liefert den Beweis für die therapeutische Wichtigkeit von Mutationsanalysen bei GEP NET.

Die Ergebnisse sollen das Streben nach Sequenzierungsstrategien der nächsten Generation anregen, die eine weitere Eingrenzung von aktivierenden Mutationen und genomischen Veränderungen bei dieser tödlichen Krankheit vornehmen.

## 8. Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Akintola-Ogunremi O, Pfeifer JD, Tan BR, Yan Y, Zhu X, Hart J, Goldblum JR, Burgart L, Lauwers GY, Montgomery E, Lewin D, Washington K, Bronner M, Xiao SY, Greenson JK, Lamps L, Lazenby A, Wang HL. 2003. Analysis of protein expression and gene mutation of c-kit in colorectal neuroendocrine carcinomas. *Am J Surg Pathol*, 27(12):1551-8.
2. Andea AA, Patel R, Ponnazhagan S, Kumar S, Devilliers P, Jhala D, Eltoum IE, Siegal GP. 2009. Merkel cell carcinoma: correlation of KIT expression with survival and evaluation of KIT gene mutational status. *Hum Pathol*.
3. Anlauf M, Gerlach P, Schott M, Raffel A, Krausch M, Knoefel WT, Pavel M, Klöppel G. 2011. Pathologie neuroendokriner Neoplasien. *Chirurg*, 82(7):567-73.
4. Anlauf M, Klöppel G, Pavel M, Raffel A. 2010. Neuroendokrine Tumoren von Magen, Darm und Pankreas. *Internationale Akademie für Pathologie Deutsche Abteilung e.V.*
5. Antonescu CR, Busam KJ, Francone TD, Wong GC, Guo T, Agaram NP, Besmer P, Jungbluth A, Gimbel M, Chen CT, Veach D, Clarkson BD, Paty PB, Weiser MR. 2007. L576P KIT mutation in anal melanomas correlates with KIT protein expression and is sensitive to specific kinase inhibition. *Int J Cancer*, 121(2):257-64.
6. Antonescu CR, Yoshida A, Guo T, Chang NE, Zhang L, Agaram NP, Qin LX, Brennan MF, Singer S, Maki RG. 2009. KDR activating mutations in human angiosarcomas are sensitive to specific kinase inhibitors. *Cancer Res*, 69(18):7175-9.
7. Basu B, Sirohi B, Corrie P. 2010. Systemic therapy for neuroendocrine tumours of gastroenteropancreatic origin. *Endocr Relat Cancer*, 17(1):R75-90.
8. Barretina J, Taylor BS, Banerji S, Ramos AH, Lagos-Quintana M, Decarolis PL, Shah K, Socci ND, Weir BA, Ho A, Chiang DY, Reva B, Mermel CH, Getz G, Antipin Y, Beroukhir R, Major JE, Hatton C, Nicoletti R, Hanna M, Sharpe T, Fennell TJ, Cibulskis K, Onofrio RC, Saito T, Shukla N, Lau C, Nelander S, Silver SJ, Sougnez C, Viale A, Winckler W, Maki RG, Garraway LA, Lash A, Greulich H, Root DE, Sellers WR, Schwartz GK, Antonescu CR, Lander ES, Varmus HE, Ladanyi M, Sander C, Meyerson M, Singer S. 2010. Subtype-specific genomic alterations define new targets for soft-tissue sarcoma therapy. *Nat Genet*.
9. Bornschein J, Kidd M, Malfertheiner P, Modlin IM. 2008. Neuroendokrine Tumoren des Gastrointestinaltraktes. *Dtsch Med Wochenschr*, 133(28-29):1505-10.
10. Corbo V, Beghelli S, Bersani S, Antonello D, Talamini G, Brunelli M, Capelli P,

- Falconi M, Scarpa A. 2011. Pancreatic endocrine tumours: mutational and immunohistochemical survey of protein kinases reveals alterations in targetable kinases in cancer cell lines and rare primaries. *Ann Oncol*.
11. Jiao Y, Shi C, Edil BH, de Wilde RF, Klimstra DS, Maitra A, Schulick RD, Tang LH, Wolfgang CL, Choti MA, Velculescu VE, Diaz LA Jr, Vogelstein B, Kinzler KW, Hruban RH, Papadopoulos N. 2011. DAXX/ATRX, MEN1, and mTOR pathway genes are frequently altered in pancreatic neuroendocrine tumors. *Science*, 331(6021):1199-203.
  12. Kartha RV, Sundram UN. 2008. Silent mutations in KIT and PDGFRA and coexpression of receptors with SCF and PDGFA in Merkel cell carcinoma: implications for tyrosine kinase-based tumorigenesis. *Mod Pathol*, 21(2):96-104.
  12. Klimstra DS, Modlin IR, Coppola D, Lloyd RV, Suster S. 2010. The pathologic classification of neuroendocrine tumors: a review of nomenclature, grading, and staging systems. *Pancreas*, 39(6):707-12.
  14. Klöppel G. 2003. Neuroendokrine Tumoren des Gastrointestinaltrakts. *Der Pathologe*, 24(4):287-296
  15. Klöppel G. 2007. Tumour biology and histopathology of neuroendocrine tumours. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 21(1):15-31.
  16. Knösel T, Emde A, Schlüns K, Chen Y, Jürchott K, Krause M, Dietel M, Petersen I. 2005. Immunoprofiles of 11 biomarkers using tissue microarrays identify prognostic subgroups in colorectal cancer. *Neoplasia*, 7(8):741-7.7
  17. Knösel T, Emde V, Schlüns K, Schlag PM, Dietel M, Petersen I. 2006. Cytokeratin profiles identify diagnostic signatures in colorectal cancer using multiplex analysis of tissue microarrays. *Cell Oncol*, 28(4):167-75.
  18. Kulke MH, Siu LL, Tepper JE, Fisher G, Jaffe D, Haller DG, Ellis LM, Benedetti JK, Bergsland EK, Hobday TJ, Van Cutsem E, Pingpank J, Oberg K, Cohen SJ, Posner MC, Yao JC. 2011. Future directions in the treatment of neuroendocrine tumors: consensus report of the National Cancer Institute Neuroendocrine Tumor clinical trials planning meeting. *J Clin Oncol*, 29(7):934-43. Epub 2011 Jan 24.
  19. Massironi S, Sciola V, Peracchi M, Ciafardini C, Spampatti MP, Conte D. 2008. Neuroendocrine tumors of the gastro-entero-pancreatic system. *World J Gastroenterol*, 14(35):5377-84
  20. Micke P, Hengstler JG, Albrecht H, Faldum A, Bittinger F, Becker K, Wiewrodt R, Fischer B, Buhl R. 2004. c-kit expression in adenocarcinomas of the lung. *Tumour Biol*, 25(5-6):235-42.
  21. Modlin IM, Kidd M, Latich I, Zikusoka MN, Shapiro MD. 2005. Current status of gastrointestinal carcinoids. *Gastroenterology*, 128 (6):1717-1751.

22. Modlin IM, Lye KD, Kidd M. 2003. A 5-decade analysis of 13,715 carcinoid tumors. *Cancer*, 97(4):934-59.
23. Modlin IM, Oberg K, Chung DC, Jensen RT, de Herder WW, Thakker RV, Caplin M, Delle Fave G, Kaltsas GA, Krenning EP, Moss SF, Nilsson O, Rindi G, Salazar R, Ruzsniwski P, Sundin A. 2008. Gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours. *Lancet Oncol*, 9(1):61-72.
24. Oberg K, Castellano D. 2011. Current knowledge on diagnosis and staging of neuroendocrine tumors. *Cancer Metastasis Rev*, 30 Suppl 1:3-7.
25. Pape UF, Jann H, Müller-Nordhorn J, Bockelbrink A, Berndt U, Willich SN, Koch M, Röcken C, Rindi G, Wiedenmann B. 2008. Prognostic relevance of a novel TNM classification system for upper gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Cancer*, 113(2):256-65.
26. Rindi G, Klöppel G, Alhman H, Caplin M, Couvelard A, de Herder WW, Eriksson B, Falchetti A, Falconi M, Komminoth P, Körner M, Lopes JM, McNicol AM, Nilsson O, Perren A, Scarpa A, Scoazec JY, Wiedenmann B; and all other Frascati Consensus Conference participants; European Neuroendocrine Tumor Society (ENETS). 2006. TNM staging of foregut (neuro)endocrine tumors: a consensus proposal including a grading system. *Virchows Arch*. 2006 Oct;449(4):395-401.
27. Rossi G, Cavazza A, Marchioni A, Longo L, Migaldi M, Sartori G, Bigiani N, Schirosi L, Casali C, Morandi U, Facciolo N, Maiorana A, Bavieri M, Fabbri LM, Brambilla E. 2005. Role of chemotherapy and the receptor tyrosine kinases KIT, PDGFRalpha, PDGFRbeta, and Met in large-cell neuroendocrine carcinoma of the lung. *J Clin Oncol*, 23(34):8774-85.
28. Schmitt AM, Anlauf M, Rousson V, Schmid S, Kofler A, Riniker F, Bauersfeld J, Barghorn A, Probst-Hensch NM, Moch H, Heitz PU, Kloepfel G, Komminoth P, Perren A. 2007. WHO 2004 criteria and CK19 are reliable prognostic markers in pancreatic endocrine tumors. *Am J Surg Pathol*, 31(11):1677-82.
29. Turaga KK, Kvols LK. 2011. Recent progress in the understanding, diagnosis, and treatment of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *CA Cancer J Clin*, 61(2):113-32.
30. Yao JC, Zhang JX, Rashid A, Yeung SC, Szklaruk J, Hess K, Xie K, Ellis L, Abbruzzese JL, Ajani JA. 2007. Clinical and in vitro studies of imatinib in advanced carcinoid tumors. *Clin Cancer Res*, 13(1):234-40.
31. Zhang L, Smyrk TC, Oliveira AM, Lohse CM, Zhang S, Johnson MR, Lloyd RV. 2009. KIT is an independent prognostic marker for pancreatic endocrine tumors: a finding derived from analysis of islet cell differentiation markers. *Am J Surg Pathol*, 33(10):1562-9.

## 9. Anhang

### 9.1. Tabellarischer Lebenslauf

#### Persönliche Daten:

|                        |   |
|------------------------|---|
| Name:                  | Danielczok  |
| Vorname:               | Christine   |
| Adresse:               | Bettelhecker Straße 27, 96515 Sonneberg   |
| Geburtsdatum und -ort: | 29. November 1986 in Sonneberg (Thüringen)  |
| Familienstand:         | ledig   |
| Staatsangehörigkeit:   | deutsch   |
| Familie:               | Eltern: Joachim Danielczok (geb. 13.05.1949 in Sonneberg, Rentner) und Dr. med. Helga Danielczok (geb. 12.07.1955 in Sonneberg, Fachzahnärztin für allgemeine Stomatologie) |

#### Bildungsweg:

|                 |   |
|-----------------|---|
| 1992 – 1996     | Besuch der Staatlichen Grundschule Juttastraße Sonneberg  |
| 1996 – 2005     | 1. Staatliches Gymnasium Sonneberg  |
| 2005            | Abitur, 1. Staatliches Gymnasium Sonneberg, Note: 1,7   |
| 2005 – 2010     | Zahnmedizinstudium/Staatsexamen an der Friedrich-Schiller-Universität Jena  |
| Seit 01.02.2011 | Vorbereitungssassistentin, Zahnarztpraxis Dr. Pfützner, Memmelsdorf   |
| Promotion:      | PD Dr. Thomas Knösel, leitender OA des Instituts für Pathologie<br>Thema: „Hohe Expressionen von KIT und PDGFRA sind mit einem kurzen Überleben der Patienten mit neuroendokrinen Tumoren assoziiert – Mutationen an den Hotspots sind jedoch selten“ Begonnen im August 2008 |

## Publikationen:

- Knösel T, Chen Y, Altendorf-Hofmann A, Danielczok C, Freesmeyer M, Settmacher U, Wurst C, Schulz S, Yang LL, Petersen I, 2011. High KIT and PDGFRA are associated with shorter patients survival in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors, but mutations are a rare event. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. Impact Factor 2,48. DOI : 10.1007/s00432-011-1107-9. Published online 08. December 2011.
- Danielczok C, Chen Y, Altendorf-Hofmann A, Freesmeyer M, Settmacher U, Wurst C, Schulz S, Yang LL, Petersen I, Knösel T. High KIT and PDGFRA are associated with shorter patients survival in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors, but mutations are a rare event. Deutsche Gesellschaft für Pathologie, Poster Tagung in Leipzig 2010.

## **9.2. Danksagung**

Mein Dank gilt Herrn PD Dr. Thomas Knösel für die Bereitstellung dieses Promotionsthemas, sowie für seine engagierte und geduldige Betreuung und Unterstützung dieser Doktorarbeit. Vielen Dank auch dafür; dass er stets Zeit und ein offenes Ohr für Fragen und Probleme sowie für konstruktive Dialoge hatte.

Desweiteren danke ich allen Mitarbeitern des Instituts für Pathologie für die stets freundliche Unterstützung.

Abschließend danke ich meinen Eltern, die mich bei diesem Studium und der Promotion stets unterstützt und motiviert haben.

### **9.3. Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist, ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind, mich keine weiteren als die angegebenen Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben, die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde, und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 22.01.2012